

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В СТОМАТОЛОГИИ И ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ХИРУРГИИ

Золотухина Е.Л.

Одесский национальный медицинский университет

Исследованы значение, классификация, методы получения, культивирования и особенности применения стволовых клеток. Представлены основные методы развития клеточных технологий и клеточной терапии. Выделены перспективы применения стволовых клеток в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Ключевые слова: стволовые клетки, клеточные технологии, клеточная терапия.

Постановка проблемы. Клеточные технологии – это новая и перспективная отрасль современной медицины. Клеточные технологии применяются сегодня при лечении весьма широкого спектра заболеваний, и во многих случаях уже достигнуты значительные успехи; еще большее число исследований сейчас находится на стадии преклинических и клинических испытаний. Стволовые клетки являются основой развития клеточных технологий. Они необходимы для разработки новых методов заместительной клеточной и тканевой терапии. Стволовые клетки – недифференцированные (незрелые) клетки, имеющиеся во всех многоклеточных организмах. Для реализации возможностей клеточной терапии при лечении трудных и инвалидизирующих заболеваний, необходимо уметь легко и надежно управлять стволовыми клетками для их успешного превращения, пересадки и приживления. Для этого необходимо, чтобы стволовые клетки могли:

1. Достаточно быстро делиться;
2. Образовывать необходимый тип клеток;
3. Не разрушаться в организме после пересадки;
4. Врастать в окружающие ткани после пересадки;
5. Выполнять необходимые функции в соответствии типа клеток;
6. Не вредить организму после пересадки.

Цель статьи. Главной целью этой статьи является изучение значения, классификации, методов получения, культивирования и особенностей применения стволовых клеток; рассмотрение основных методов развития клеточных технологий и клеточной терапии, а также перспектив применения стволовых клеток в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Изложение основного материала. Впервые методики культивирования мышечных эмбриональных стволовых (мЭС) клеток были предложены в 1981 году. Человеческие эмбриональные стволовые (чЭС) клетки впервые изолировали в 1994 году, а первые стабильные линии чЭС клеток получили в 1998 году.

Термин «стволовая клетка» был введен Александром Максимовым в 1908 году. Родоначальником клеточной терапии является русский врач – эмигрант С. Воронцов, в 20–30-е годы в Париже он пересаживал фетальные ткани для предупреждения преждевременного старения.

Стволовые клетки обладают свойствами:

1. Самообновления, то есть способность сохранять неизменный фенотип после деления (без дифференцировки).
2. Универсальности – отсутствия у них специфических структур, дающих им возможность выполнять определенные функции. Стволовые клетки могут превращаться в разные клетки организма.

3. Потентности (дифференцирующий потенциал) – способности давать потомство в виде специализированных типов клеток.

В зависимости от этого стволовые клетки делятся на следующие группы:

1. Тотипотентные. Такие клетки могут дать начало полноценному жизнеспособному организму. К ним относится оплодотворенная яйцеклетка, или зигота.
2. Плюрипотентные. Из этих стволовых клеток развиваются три зародышевых листка: эктодерма, мезодерма и энтодерма.
3. Мультипотентные стволовые клетки порождают клетки разных тканей, но в пределах одного зародышевого листка
4. Олигопотентные клетки могут дифференцироваться лишь в некоторые, близкие по свойствам, типы клеток

5. Унипотентные незрелые клетки, которые, строго говоря, уже не являются стволовыми, так как могут производить лишь один тип клеток. Они способны к самовоспроизведению, но только в определенном типе ткани.

Очень важно для исследований это определение сигналов побуждающих популяцию стволовых клеток к размножению и сохранению универсальности. Стволовые клетки классифицируются как:

1. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) образуют внутреннюю клеточную массу (ВКМ), или эмбриобласт, на ранней стадии развития эмбриона. Они являются плюрипотентными. Получают их путем выделения из эмбрионов, полученных из оплодотворенной в пробирке яйцеклетки в специализированных клиниках искусственного оплодотворения. чЭС клетки выделяют из эмбриона трех или пятидневного возраста с помощью избирательного комплемент-зависимого лизиса бластоцист с последующим удалением трофобластов или путем растворения гликопротеиновой мембраны бластоцист ферментом проназой.

Ранее для выращивания культуры клеток использовали фидерный слой из ЭСК мышцы на дне лабораторной чашки, чтобы дать клейкую поверхность для клеток внутренней клеточной массы. Однако, такой метод создает условия для загрязнения культуры ЭСК ксеногенными белками и вирусами животных. Для предупреждения этого используют новый метод культивирования с помощью белка Ламинин-51, к которому прикрепляются клетки.

При культивировании в течении шести и более месяцев ЭСК могут дифференцироваться в любые другие типы клеток.

2. Фетальные стволовые клетки получают из плодного материала после аборта (обычно срок внутриутробного развития плода составляет 9–12 недель). Эти клетки плюрипотентны. Они имеют некоторые преимущества перед взрослыми: пластич-

ны, антигены гистосовместимости выражены очень слабо, и реакция отторжения незначительна, а также можно выбрать СК, уже начавшие дифференцировку в определенном направлении.

3. Постнатальные стволовые клетки присутствуют в уже сформировавшихся тканях взрослого организма. Эти клетки мультипотентны. В зависимости от условий, создающих фон для дифференцировки и роста, эти клетки способны дифференцироваться в клетки другой ткани. Главной задачей постнатальных стволовых клеток является реконструкция пораженных тканей. Подразделяются на три основных группы: гемопоэтические (кроветворные), мультипотентные мезенхимальные (стромальные), тканеспецифичные клетки-предшественницы. Больше всего СК в костном мозге. Впервые пересадку костного мозга пациенту с лейкемией провел американский врач Дон Томас в 1969 году, за что в 1990-м был удостоен Нобелевской премии.

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – мультипотентные стволовые клетки, дающие начало всем клеткам крови миелоидного и лимфоидного рядов.

Источники ГСК:

1. Красный костный мозг
2. Пуповинная кровь
3. Стимулированная периферическая кровь после активации костного мозга с помощью специальных фармакологических препаратов.

Наиболее важным и перспективным источником ГСК является пуповинная кровь. Преимущество пуповинной крови как источника СК в том, что кровь собирают на самом раннем этапе жизни, когда она еще не была подвержена действию окружающих факторов, а также использование пуповинной крови дает гарантию на полную совместимость материала. Клетки пуповинной крови обладают абсолютной генетической идентичностью к тканям хозяина и частичной к тканям матери и близких родственников. Содержание кроветворных стволовых клеток может достигать 1-2% от общего числа лейкоцитов (0,3 – 0,5%). Трансплантация выполняется из расчета числа клеток к весу ребенка, следовательно, нужно стараться сохранить как можно больше клеток. Эти клетки мультипотентны и дифференцируются в клетки ограниченного числа типов.

В 1992 году была собрана первая именная коллекция стволовых клеток. Профессор Дэвид Харрис заморозил стволовые клетки пуповинной крови своего первенца, а первая трансплантация стволовых клеток пуповинной крови была произведена в 1998 году во Франции больному с анемией.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки способны дифференцироваться в остеобласты (клетки костной ткани), хондроциты (хрящевые клетки) и адипоциты (жировые клетки). Они способны подавить иммунную реакцию в ответ на трансплантацию, таким образом, для трансплантации можно использовать аллогенные мезенхимальные СК, не обладающие полной совместимостью. Источниками ММСК являются костный мозг, жировая ткань, пуповинная кровь, пульпа молочных зубов, амниотическая (окоплодная) жидкость, Вартоновский студень.

Тканеспецифичные прогениторные клетки располагаются в различных тканях и органах, отвечают за обновление клеточной популяции ткани. Эти клетки являются олиго- и унипотентными и могут делиться определенное количество раз. К ним относятся нейрональные стволовые клетки, стволовые клетки кожи, скелетной мускулатуры, миокарда,

жировой ткани и стромальные клетки спинного мозга.

Существует и другой способ получения стволовых клеток из каких-либо иных клеток путем эпигенетического перепрограммирования. Такие клетки называются **индуцированными стволовыми клетками**. Существуют *индуцированные тотипотентные клетки*, которые используют для клонирования и получения генетически модифицированных животных. Получают их с помощью переноса ядер соматических клеток в ооциты-реципиенты. Так была получена зигота знаменитой овечки Долли. *Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)* получают путем трансфекции определенных генов стволовых клеток в неплюрипотентную клетку человека с помощью вирусных векторов (ретровирусов). Впервые индуцированные стволовые клетки были синтезированы из клеток мыши в 2006 году, из клеток человека – в 2007 году. Это дало прорыв в развитии клеточных технологий, так как появилась возможность не использовать для исследования эмбрионы. *Индукцированные прогениторные (мультипотентные или унипотентные)* стволовые клетки, получаемые прямым перепрограммированием, называют индуцированными соматическими стволовыми клетками (ИССК).

В 2006 году японские исследователи во главе с Шинья Яманака (Shinya Yamanaka) впервые превратили фибробласты мыши в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, используя для модификации клетки четыре репрограммирующих гена: Oct4, Klf4, Sox2 и с-Мус, для трансфекции в ядро использовали ретровирусы. В 2007 году Яманака трансформировал фибробласт человека в плюрипотентную клетку, используя те же самые четыре гена с ретровирусной системой.

Открытие возможности использования собственных клеток пациента для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток стало прорывом в области клеточной терапии для лечения тяжело излечимых заболеваний.

В стоматологии и челюстно-лицевой хирургии трансплантация мезенхимальных стволовых клеток может применяться для восстановления целостности костей краниофациальной области или регенерации тканей зуба.

Стволовые клетки, выделенные из костного мозга, при трансплантации обеспечивают восстановление поврежденной костной ткани лица и челюсти, а клетки, полученные из пульпы зуба, восстанавливают поврежденный дентин.

Мезенхимальные стволовые клетки могут трансформироваться в клетки костной ткани, это дает возможность использования МСК для восстановления целостности костной ткани после удаления раковой опухоли, деструктивных заболеваний костной ткани, травм или при системных прогрессирующих заболеваниях. Исследованиями доказано, что при восстановлении костной ткани с помощью МСК происходит ускорение регенерации и увеличение плотности кости по сравнению с естественными процессами.

Недавно ученым удалось выделить стволовые клетки из пульпы зуба взрослого человека. Оказалось, что стволовые клетки пульпы зуба делятся еще быстрее стволовых клеток из костного мозга.

Выращивание зубов – перспективная биоинженерная технология, конечной целью которой является создание (воссоздание) полноценных новых коренных зубов у человека или животных.

В 2002 году английские учёные под руководством профессора Пола Шарпа научились выращивать

практически целые, но слабые зубы из отдельных клеток. Для этого использовали зубы шестимесячных поросят. Выделенные незрелые клетки зуба помещали на полимерные подкладки, которые впоследствии растворяются, затем их пересаживали крысам. Через тридцать недель у крыс формировались небольшие зубы, содержавшие эмаль, дентин, одонтобласты.

В 2009 году японские исследователи под руководством Такаши Тсуи (Takashi Tsuji) вырастили из стволовых клеток полноценные зубы для мышей, однако выращенные зубы оказались немного меньше «родных» зубов. Для этой цели использовали клетки мышинного эмбриона. После их стимулирования к размножению их помещали в коллагеновую матрицу, для контроля размеров зачатков зубов использовали специальные емкости с пластиковыми кольцами. Выращенные зародыши пересаживали в лунки удаленных зубов. В растущие зубы успешно прорастали капилляры и нервы, следовательно, развивались полноценные зубы. Эта операция стала первым удачным опытом успешной замены целого органа биоматериалами.

А вот американские ученые во главе с Джереми Мао разработали другую методику выращивания зубов без этапа выделения и культивирования стволовых клеток. Для этого в лунку удаленного зуба крепятся своего рода «строительные леса» из полимера и гидроксилатапата, сконструированные с помощью 3D-принтера. На матрицу закрепляют молекулы факторов роста SDF1 и белков BMP7, являющиеся сигналом для притягивания собственных стволовых клеток из организма. И так, в течении девяти недель поверхность «строительных лесов»

покрывается массой клеток дентина. Однако полная регенерация тканей зуба не достигнута.

В 2010 г. Институт клеточной терапии вступил в Международное общество клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy – ISCT). На базе которого был создан первый в Украине криобанк стволовых клеток пуповинной крови в 2004 г. Криобанк обладает значительной научно-исследовательской базой, позволяющей осуществлять забор и хранение стволовых клеток по уникальной запатентованной технологии, благодаря которой до 96% клеток сохраняют свою жизнеспособность после размораживания. Это позволило Криобанку Института клеточной терапии получить международную аккредитацию.

На сегодняшний день в Украине накоплен положительный опыт применения стволовых клеток в результате проведения клинических испытаний, которые законодательно закреплены Приказом МЗ Украины №630 «О проведении клинических испытаний стволовых клеток», от 2008 г.

Выводы и предложения. Актуальность проблемы стволовых клеток не вызывает сомнений. Клеточные технологии с применением стволовых клеток – молодая и перспективная отрасль медицины. В будущем ученые надеются создавать из стволовых клеток ткани и целые органы, необходимые для трансплантации и восстановления нормальной жизнедеятельности организма реципиента. Преимущество этого метода в том, что ткани можно вырастить из клеток самого пациента, и они не будут вызывать реакции отторжения. В частности использование стволовых клеток для восстановления и регенерации костной ткани открывает широкие перспективы в челюстно-лицевой пластической хирургии.

Список литературы:

1. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови // Вопросы онкологии. – 2000. – Т. 46. – № 5.
2. Прыжкова, М.В., Закеева, И.Р., Кибардин, А.В., Георгиев, Г.П., Киселев, С.Л. Использование генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток для получения трансгенных животных. Генетика. 2004, том 40, №3: 1-5.
3. Репин В.С. Праматерь всех клеток // Наука и жизнь. – 2001. – № 10.
4. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Кращенко М.Е., Зайденов В.А., Потапов И.В., Башкина Л.В., Берсенева А.В. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов // Вестн. Трансплантологии и искусственных органов. – 2002. – № 4.
5. Amit, M., Itskovitz-Eldor, J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. J Anat. 2002, 200: 225-232.
6. Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M., Peault, B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992, 89: 2804-2808.
7. Gandarillas, A. Watt, F.M. c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. Genes Dev. 1997, 11: 2869-2882.

Золотухина О.Л.

Одесский национальный медицинский университет

СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ І ПЕРСПЕКТИВИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ В СТОМАТОЛОГІЇ ТА ЩЕЛЕПНО-ЛИЦЕВОЇ ХІРУРГІЇ

Анотація

Досліджено значення, класифікація, методи отримання, культивування та особливості застосування стовбурових клітин. Представлені основні методи розвитку клітинних технологій і клітинної терапії. Виділено перспективи застосування стовбурових клітин в стоматології та щелепно-лицевої хірургії.

Ключові слова: стовбурові клітини, клітинні технології, клітинна терапія.

Zolotukhina O.L.
Odessa National Medical University

STEM CELLS AND PROSPECTS FOR THEIR USE IN DENTISTRY AND MAXILLOFACIAL SURGERY

Summary

Investigated the value, classification, methods of obtaining, cultivation and application of stem cells. Highlighted stem cells and prospects for their use in dentistry and maxillofacial surgery.

Keywords: stem cells, cell technology, cell therapy.

УДК 616.24-008.9-056.7-07-036-053.2(477.63)

СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ДІАГНОСТИКИ ТА ОСОБЛИВОСТІ КЛІНІЧНОГО ПЕРЕБІГУ МУКОВІСЦИДОЗУ У ХВОРИХ ДІТЕЙ МІСТА ДНІПРОПЕТРОВСЬКА

Ільченко С.І.

Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України

Іванусь С.Г.

КЗ «Дніпропетровська дитяча міська клінічна лікарня №2» ДОР»

Проаналізовано сучасні статистичні дані щодо розповсюдженості муковісцидозу у дітей та підлітків в м. Дніпропетровську за останні 5 років. Проаналізовано клініко-амнестичні дані, проведена оцінка фізичного розвитку хворих на муковісцидоз, висновків рентгенологічних, сонографічних, спірометричних, лабораторних досліджень. Уточнена структура захворювання за клінічними формами. Визначено основні причини пізньої діагностики муковісцидозу у дітей в сучасних умовах. Вивчено фактори, що знижують якість життя пацієнтів та є причиною несприятливого перебігу та прогнозу захворювання.

Ключові слова: муковісцидоз, діти, підлітки, діагностика, прогноз.

Актуальність проблеми. Муковісцидоз (МВ) – найбільш часта спадкова патологія представників білої раси, яка характеризується мультисистемним ураженням, зумовленим мутацією гену МВТР (муковісцидозного трансмембранного регулятора провідності), який викликає порушення транспорту іонів хлору, натрію і бікарбонатів у епітеліальних клітинах, що приводить до прогресуючого пошкодження екзокринних залоз життєво важливих органів. Порушення гідратації секретів екзокринних залоз порушує їх реологічні властивості, робить їх в'язкими, викликаючи обструкцію вивідних протоків, що пояснює більшість патологічних процесів, які лежать в основі патогенезу захворювання. МВТР широко розповсюджений в організмі (легені, слинні залози, підшлункова залоза, печінка, вивідні протоки потових залоз, репродуктивний тракт), що пояснює мультисистемні ураження органів при МВ [4, 5, 6, 7]. Прогноз захворювання завжди серйозний.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. На сучасному етапі пройшли принципові зміни в розумінні природи хвороби на клітинному і молекулярно-генетичному рівні, розширений спектр діагностичних можливостей. Не виключено, що згодом число дорослих пацієнтів у більшості розвинутих країн перевищить число дітей.

На даний час виявлено більше 1900 мутацій та біля 250 поліморфізмів в гені МВТР. Мутації виявлені як в кодуючих, так і в інтронних, і в регуляторних частинах гену МВТР [1]. Частота зустрічі й розподілу МВТР-мутацій значно відрізняються в різних популяціях. Однією з найпоширеніших є F508 del [1].

Згідно даних Медико-генетичного науково-го центру РАМН, в Росії частота F508 del мутації складає 54,2%. Другою по частоті мутацією серед слов'янського населення Європейської частини Ро-

сії є CFTR dele 2,3 (21kb) – слов'янська мутація, яка зустрічається у 7,2%. Тринадцять мутацій сумарно складає 75,7% всіх мутантних алелей [2].

Клінічний поліморфізм МВ пояснюється комплексом взаємодіючих факторів: МВТР-генотипу, генів-модифікаторів, зовнішньосередовищними впливами, в тому числі і терапії. Дослідження клінічних проявів у хворих МВ показало більш важкий перебіг захворювання, ранню маніфестацію легеневих проявів з раннім інфікуванням P.aeruginosa, пониження нутритивного статусу і ураження печінки у хворих, гомозиготних по мутації F508 del, у порівнянні з іншими мутаціями. У хворих з генотипом F508 del/ CFTRdele2,3(21kb) діагноз МВ встановлювався в більш ранні строки, що свідчить про ранню маніфестацію як прояв з боку шлунково-кишкового тракту, так і з боку легенів, ранне пониження показників функції зовнішнього дихання (ФЗД). Ураження печінки, меконеальний ілеус, синдром дистальної інстегіальної обструкції спостерігали в цих хворих частіше, ніж у пацієнтів з іншими генотипами, хоча ці відміни і не досягали рівня достовірної значимості [3, 8].

Виникнення більшості клінічних проявів захворювання пов'язане з продукцією секретів підвищеної в'язкості зі зміненими фізико-хімічними властивостями, що веде до збільшення концентрації електролітів і білків у різних секретах при зменшенні водної фази. Цей механізм лежить в основі двох секреторних аномалій, характерних для МВ-високої концентрації електролітів (натрія хлориду і т.д.) в потовій рідині й ряду інших секретів і виділенні дуже в'язкого муцину всіма слизовими залозами організму. Утруднення відтоку в'язкого секрету веде до його застою з наступним розширенням вивідних протоків залоз, атрофією залозної тканини, прогресуючим фіброзом.

Класичний муковісцидоз характеризується прогресуванням бронхолегеневих змін, панкреативною